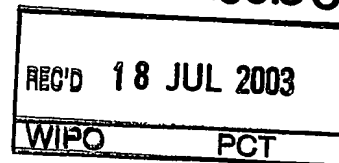


REC'D PCT/PTO 28 DEC 2004
PCT/JP 03/08080
26.06.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月28日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-190674

[ST.10/C]: [JP2002-190674]

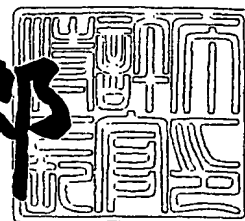
出 願 人
Applicant(s): 株式会社生物有機化学研究所

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月28日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3011281

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 184471

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61L 27/00
C08L 5/00

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南二十一条西11丁目3-11-2
 01

 【氏名】 眞島 任史

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北三条西14丁目1-212-2-
 803

 【氏名】 岩崎 倫政

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市東区北二十三条東9丁目1-19

 【氏名】 船越 忠直

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区宮ヶ丘2丁目1-30-1003

 【氏名】 三浪 明男

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北九条西16丁目1-1-302

 【氏名】 西村 紳一郎

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府吹田市泉町5-13-16-103

 【氏名】 戸倉 清一

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市厚別区厚別東三条7丁目3-27

 【氏名】 原田 和夫

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区豊平七条7丁目1-20

【氏名】 野中 佐智子

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市清田区美しが丘三条6丁目1-1-305

【氏名】 前川 宣彦

【特許出願人】

【識別番号】 500503551

【住所又は居所】 北海道札幌市清田区美しが丘四条9丁目2番1号

【氏名又は名称】 株式会社生物有機化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100098925

【弁理士】

【氏名又は名称】 上田 敏夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0202656

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 線維芽細胞培養方法および靱帯・腱組織再生基材

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる線維芽細胞培養用の担体。

【請求項 2】 成形物が非局所的に酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む請求項 1 に記載の担体。

【請求項 3】 成形物の表面に酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む請求項 1 に記載の担体

【請求項 4】 酸性生体高分子又は塩基性生体高分子の表面が酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体で被覆されている請求項 3 に記載の担体。

【請求項 5】 複合体の成形物が繊維である請求項 1～4 のいずれかに記載の担体。

【請求項 6】 複合体の成形物が膜である請求項 1～4 のいずれかに記載の担体。

【請求項 7】 複合体の成形物が、繊維集合体、織物、編物、又は不織布である請求項 5 に記載の担体。

【請求項 8】 酸性生体高分子がカルボキシル基、硫酸基、スルホン酸基、スルフヒドリル基、又はリン酸基を有する請求項 1～7 のいずれかに記載の担体。

【請求項 9】 酸性生体高分子がアルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ポリグルタミン酸よりなる群から選択される請求項 8 に記載の担体。

【請求項 10】 塩基性生体高分子がアミノ基、イミノ基、又はグアニノ基を有する請求項 1～9 のいずれかに記載の担体。

【請求項 11】 塩基性生体高分子がキトサン、ポリリジン、又はポリアルギニンである請求項 10 に記載の担体。

【請求項 12】 酸性生体高分子がアルギン酸、ヒアルロン酸の少なくとも一つであり、塩基性生体高分子がキトサンである請求項 9 又は 11 に記載の担体

【請求項 1 3】 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の担体を培養担体として用いて線維芽細胞を生体外で培養することを含む線維芽細胞の培養方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の担体、及び該担体に付着する線維芽細胞を含む移植用靱帯・腱組織再生基材。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体外で線維芽細胞を培養し靱帯または腱組織に分化させる線維芽細胞培養方法、該方法に用いる 3 次元培養担体、および該方法により得られる靱帯損傷または腱損傷を再生させるための移植用靱帯・腱組織再生基材に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

事故やスポーツによる靱帯（特に膝の関節を固定している膝前十字靱帯）や腱の損傷の治療では、自己の正常な靱帯あるいは腱の一部を移植する再建術が行われているが、この治療法では移植に使用した正常部位の筋力が半分程度に低下してしまい、運動機能に支障を生じることが大きな問題となっている。

また、人工の合成繊維から成る人工靱帯を移植する手術も従来から検討されてきたが、細胞が付着しないために人工物が時間の経過とともに擦り切れてしまうという問題があり、現在は殆ど使用されていない状況にある。

また、再形成外科手術における組織移植を増加させる観点から、骨形態形成タンパク（BMP）と適当な担体（コラーゲンスポンジ、コラーゲンゲル、セルロース性ゲル、多孔性粒子状ポリマー）を含有する組成物を結合組織と骨との間に投与し、結合組織と骨との付着を再生する方法がある（特表平11-507032号公報）

さらに、再生医療の観点から線維芽細胞や平滑筋細胞、内皮細胞等の間質細胞を生分解性材料（ポリグリコール酸、綿、腸線縫合糸、セルロース、ゼラチン、

コラーゲン、ポリヒドロキシアロカノエート) または非生分解性材料 (ポリアミド化合物、ポリエステル化合物、ポリスチレン化合物、ポリプロピレン化合物、ポリアクリレート化合物、ポリビニル化合物、ポリカーボネート化合物、ポリテトラフルオロエチレン化合物、ニトロセルロース化合物) から成る 3 次元支持体 (フレームワーク) に埋め込んで培養し、間質細胞と間質細胞が自然に分泌する結合組織タンパク質によって架橋される 3 次元構造物を包んだ生間質組織を調製し、この構造物を移植または埋め込む方法も報告されている (特表平11-506611 号公報)。

また、天然の高分子を用いて靱帯や腱を再構築するための線維芽細胞培養用担体として、コラーゲンのスポンジやファイバー (Dunn, M. G. et al., J. Biomed. Mater. Res., 29, 1363-1371 (1995))、コラーゲンにグリコサミノグリカン結合させたスポンジ状の構造物 (Torres, D. S., et al., Biomaterials, 21, 1607-1619 (2000))、ポリ乳酸のファイバーの表面にコラーゲンを結合させた構造物 (Ide, A., et al., Mater. Sci. Eng., C17, 95-99 (2001))、コラーゲンファイバーにノルジヒドログアヤレチン酸を架橋した構造物 (Koob, T. J., et al., J. Biomed. Mater. Res., 56, 40-48 (2001)) 等を用いて、線維芽細胞の増殖性や靱帯組織の再生検討が報告されている。

しかし、このようなコラーゲンを使用する方法ではコラーゲン担体が生体と同種的なものであることから、これに伴う抗原性や感染が深刻な問題となる可能性が高い。また、コラーゲンゲルやコラーゲンを用いた担体は変位を受けて元に戻る事が困難であり、生分解性の合成ポリマーのような変位に対する弾力性に欠けていることも靱帯や腱の再生担体としては大きな問題となる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は従来技術における上記課題を解決するためになされたものである。即ち、本発明は損傷した靱帯または腱を再生させるための、生分解性、生体適合性を有し、十分な機械的強度、弾力性および柔軟性を保持した靱帯または腱再生用基材を提供することを目的とする。本発明はまた、そのような靱帯または腱再生用基材を製造する方法を提供することを目的とする。本発明はさらに該靱帯また

は腱再生用基材を製造するのに適する線維芽細胞の担体を提供することをも目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、線維芽細胞の培養方法について鋭意研究を重ねた結果、人工の細胞外マトリックスとして酸性生体高分子と塩基性生体高分子の複合体を含む成形物を培養担体として用いることにより、靱帯損傷または腱損傷部位を再生させるに適した、生分解性、生体適合性を有し、十分な機械的強度、弾力性および柔軟性を保持した靱帯または腱組織再生用基材が得られることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

即ち、本発明は先ず、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる線維芽細胞培養用の担体に関する。

本発明はまた、該担体を培養担体として用いて線維芽細胞を生体外で培養することを含む線維芽細胞の培養方法にも関する。

本発明はさらに、上記の担体および該担体に付着する線維芽細胞を含む移植用靱帯または腱組織再生基材にも関する。

【0005】

【発明の実施の形態】

本明細書で用いる「酸性生体高分子」とは、カルボキシル基、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基等の酸性の基を有する天然に由来する高分子、またはその塩をいう。好ましい態様では生体高分子は多糖類である。天然に存在する高分子を加水分解に付して上記酸性基またはその塩を生じさせたものも「酸性生体高分子」に含む。また、天然に存在する生体高分子をいずれかの物理的、化学的、あるいは酵素的手段により低分子量化したものも「酸性生体高分子」に含む。しかしながら、酸性生体高分子の分子量は少なくとも50,000、好ましくは少なくとも100,000であることが必要である。

【0006】

カルボキシル基を有する酸性生体高分子の例としては、グルコン酸、グルクロン酸、イズロン酸、D-マンヌロン酸、ガラクトuron酸、グルロン酸、シアル酸を

含むポリマー、例えばヒアルロン酸、アルギン酸、ヘパリン等が挙げられる。

【0007】

硫酸基を有する酸性生体高分子の例としてはコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸等が挙げられる。リン酸基を有する酸性生体高分子の例としてはDNA、RNA等が挙げられる。複合体の製造においてこれらの酸性生体高分子の2種以上を用いてよい。

【0008】

本明細書において「塩基性生体高分子」とはアミノ基、イミノ基、グアジノ基等の塩基性の基を有する天然に由来する高分子またはその塩をいう。天然に存在する生体高分子を加水分解に付して上記塩基性の基またはその塩を生じさせたものも「塩基性生体高分子」に含む。また天然に存在する高分子をいずれかの物理的、化学的、あるいは、酵素的手段により低分子量化したものも「塩基性生体高分子」に含む。しかしながら、塩基性生体高分子の分子量は少なくとも300、好ましくは少なくとも700、より好ましくは少なくとも1,000であることが必要である。塩基性生体高分子の例はキトサン、ポリアミン、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリガラクトサミン、ヒストン、クロマチン等である。複合体の製造においてこれらの塩基性生体高分子の2種以上を用いてもよい。

【0009】

酸性生体高分子と塩基性生体高分子の好ましい組み合わせの例は、アルギン酸-キトサン、アルギン酸-ポリリジン、アルギン酸-ポリアルギニン、ヒアルロン酸-キトサン、ヒアルロン酸-ポリリジン、ヒアルロン酸-ポリアルギニン等であるが、これらに限定されない。これらの複合体は生体親和性と生体適合性および生分解性を保持し、生体への移植に適した性質を有する。

【0010】

負の電荷を有する酸性生体高分子と正の電荷を有する塩基性生体高分子の間の静電的相互作用により複合体が形成される。複合体の生成には酸性生体高分子と塩基性生体高分子を適当な媒体、例えば水中で接触させればよい。

【0011】

本発明の線維芽細胞培養用の担体は酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複

合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる。1の態様では酸性生体高分子又は塩基性生体高分子よりなる該成形物の表面が酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体で被覆されている。他の態様では、該成形物は非局所的に、即ち全体的に、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む。好ましくは、成形物は繊維、繊維集合体、織物、編物、不織布または膜である。

【0012】

酸性生体高分子又は塩基性生体高分子の繊維又は膜への成形は、湿式紡糸又は湿式製膜法を用いて行なうのが便利である。湿式紡糸又は湿式製膜法では高分子をその溶剤に溶解して溶液を調製し、その溶液をノズル又はスリットを通してその高分子の凝固剤中に押し出すことにより繊維状又は膜状とする。

酸性生体高分子又は塩基性生体高分子の溶液は適当な溶媒を用いることにより容易に調製することができる。酸性生体高分子又は塩基性生体高分子が水溶性であれば溶媒として水を用いることができる。

凝固剤としては水と相溶性の有機溶媒、水と相溶性の有機溶媒／水の混合溶媒、及び塩の水溶液等を挙げることができる。水と相溶性の有機溶媒の好ましい例はメタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類である。メタノールが好ましい。混合溶媒における水／アルコールの割合は10／90～90／10（容量／容量）、好ましくは45／55～55／45（容量／容量）である。凝固剤に用いる塩としてはカルシウム塩、バリウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属の塩であるが、塩化カルシウムが特に好ましい。塩の濃度は0.1％～飽和濃度である。

上記高分子の溶液を凝固剤を含む凝固浴中に押し出して、該高分子を凝固させる。この場合凝固浴は単一である必要はなく、複数の凝固浴を用いてもよい。例えば第一凝固浴をアルカリ土類金属の水溶液とし、第二凝固浴を水／アルコールの混合溶媒にアルカリ土類金属を溶解した溶液とし、第三凝固浴を水／アルコールの混合溶媒とし、第四凝固浴をアルコールとすることもできる。このように複数の凝固浴を用いることにより凝固や脱水をより完全なものとする。

【0013】

酸性生体高分子（又は塩基性生体高分子）よりなる成形物の表面に酸性生体高

分子と塩基性生体高分子との複合体が被覆されている繊維又は膜を製造するには、上記のいずれかの凝固浴に塩基性生体高分子（又は酸性生体高分子）を添加しておく。典型的には以下のように製造する。

- (1) 酸性生体高分子（又は塩基性生体高分子）の溶液を調製し；
- (2) 該溶液を、第1凝固浴中に押し出して高分子を凝固させる；
- (3) 該凝固物を、塩基性生体高分子（又は酸性生体高分子）を添加した第2凝固浴に浸漬し；
- (4) 場合により該凝固物を延伸する。

工程(1)で酸性生体高分子を用いた場合には工程(3)の凝固浴には塩基性生体高分子を用い、工程(1)で塩基性生体高分子を用いた場合には工程(3)の凝固浴には酸性生体高分子を用いる。第1凝固浴で酸性生体高分子又は塩基性生体高分子が凝固し、第2凝固浴でその表面で酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体が形成される。

【0014】

成形物の全体的に、即ち非局所的に酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む成形体は典型的には以下のように製造する。

- (1) 酸性生体高分子と塩基性生体高分子の複合体の溶液を調製し；
- (2) 該複合体の溶液を、第1凝固浴中に押し出して複合体を凝固させ；
- (3) 該凝固物を、第2凝固浴に浸漬し；
- (4) 場合により該凝固物を延伸する。

【0015】

複合体の溶液は、例えば、酸性生体高分子の溶液と塩基性生体高分子の溶液を混合すれば得ることができる。凝固浴の組成は上に記載したのと同様である。

【0016】

本発明の成形物が繊維である場合には、例えば以下のようにして製造することができる。高分子溶液を適当な紡糸ノズルから第1凝固浴槽に押し出し、次に第2凝固浴槽に移した後、第1ローラーと第2ローラーで適切な延伸倍率で延伸した後、巻き取りローラーで巻き取る。このようにして巻き取った繊維はアルコールなどに浸漬し、洗浄後、風乾する。

【0017】

本発明の成形物が膜である場合には、例えば以下のようにして製造することができる。高分子溶液を適当なスリットから第1凝固浴槽に押し出し、次に第2凝固浴槽に移した後、第1ローラーと第2ローラーで適切な圧延倍率で延伸した後、巻き取りローラーで巻き取る。このようにして巻き取った膜はアルコールなどに浸漬洗浄後、風乾する。

【0018】

本発明ではこのようにして得られた成形物を線維芽細胞の培養担体として用いる。線維芽細胞を培養することにより成形物を被覆するように線維芽細胞が増殖し、結合組織が形成される。従って、成形物を更に加工して、増殖した組織が占め得る3次元的空间を有する構造体とすることが好ましい。そのような構造体の例には、これらに限定されるものではないが、繊維を束ねた繊維集合体、織物、編物、不織布、膜を穿孔したもの、スポンジ状に加工したもの、折り重ねたもの等がある。

【0019】

本発明の成形物は培養担体として以下のような好ましい性質を有する。

- 1) 線維芽細胞の培養において細胞の播種が容易であり、播種時、及び増殖した線維芽細胞が培養担体に吸着・接着する。
- 2) 線維芽細胞が担体の表面で増殖し、コラーゲンなど細胞外マトリックスが分泌され結合組織を形成する。
- 3) 形成された結合組織が占め得る3次元的空间を有する。
- 4) 生体適合性および生分解性を有し、十分な機械的強度を有する。

【0020】

上記の3次元培養担体を用いる培養は通常の動物細胞培養法（例えば、Klagsb urn, M., "Large Scale Preparation of Chondrocytes", Methods in Enzymol., 58:560(1979)を参照）に準じて行う。先ず、予め、該培養担体をオートクレーブで加熱滅菌するか、ガス殺菌を行い形状・特性が壊れないように殺菌処理を施し、殺菌した培地に添加する。次に、線維芽細胞を培養担体上にできるだけ3次元的に均一に播いて培養する。培養に使用する線維芽細胞としてはウサギ、ウシ

、ウマ、イヌ、ネコ、ヒト等の哺乳動物由来の線維芽細胞であれば、いずれの細胞でも培養可能である。好ましい線維芽細胞は、ヒト由来のものであり、特に好ましいのは移植しようとする患者由来の線維芽細胞である。

【0021】

培地としては通常の動物細胞培養法で用いられるもの、例えば牛胎児血清を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) などが使用出来る。従来の培養担体を用いて培養する場合、結合組織を再生させるためいずれかの成長因子、例えばFGFやTGF β などの添加が必要があるが、本発明の培養担体を用いると、このような成長因子の添加なしに培養しても、細胞外マトリックスが分泌され、結合組織の再生が誘導される。ただし、本発明の培養担体を用いた培養に各種成長因子を添加することは可能である。

【0022】

線維芽細胞の培養時において培養担体の上へ細胞が均一に播種できることが重要であり、このためには線維芽細胞の付着・吸着性の高い培養担体は極めて重要である。培養温度は30℃～37℃である。培養器として小スケール培養では12穴培養用プレートあるいは24穴プレートに培養担体を置いて培養するが、さらに大きなスケールでは大型のポリスチレン樹脂容器や角形培養フラスコ（ガラス製）等を使用し、振とうしながら細胞増殖の均一化を図る。

【0023】

培養は、少なくとも細胞外マトリックスが形成されるまで行なう。通常、培養2～4週間程度で線維芽細胞が本発明の3次元培養担体の上に良好に接着、増殖し、コラーゲン様の細胞外マトリックスが形成される。

【0024】

このようにして製造される、本発明の、酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を含む成形物、及び該成形物に付着する線維芽細胞を含む基材は、靱帯や腱の修復のための移植用基材として好適に用いることができる。

【0025】

【実施例】

製造例 1

アルギン酸とキトサンのハイブリッド繊維（１）および（２）の製造

アルギン酸濃度４％の条件で紡糸したアルギン酸単独繊維、アルギン酸４％をキトサン濃度０.０５％の凝固液中で紡糸したアルギン酸－キトサンハイブリッド繊維（１）、およびアルギン酸４％をキトサン濃度０.１％の凝固液中で紡糸したアルギン酸－キトサンハイブリッド繊維（２）を調製した。

４（重量／容量）％のアルギン酸ナトリウム（紀文フードケミファ社製、NSPH2、分子量：約600,000）水溶液をカラム（ガラス製、内径４５mm、長さ４１０mm）に詰め、濾布で加圧（ 0.6kgf/cm^2 ）濾過した。この濾液を紡糸用カラム（ガラス製、内径４５mm、長さ４１０mm）に詰め、これを紡糸液として簡易紡糸装置を用い、以下のような方法によって繊維を作製した。50ホール（小孔： $\phi 0.1\text{mm}$ ）のノズルから、 0.6kgf/cm^2 の加圧下で０.０５％（重量／容量）キトサン（焼津水産化学工業社製、分子量：約18,000）を含む３％（重量／容量）塩化カルシウム水溶液中（第１凝固浴：浴長50cm、容量約１L）に上記紡糸液を押出し、次に塩化カルシウムの３％（重量／容量）溶液（水／メタノール＝１／１（容量））に浸漬（第２凝固浴：浴長100cm、容量約２L）した後、ローラー（第１ローラー：速度6.8m/min、第２ローラー：7.2m/min、延伸倍率1.06）にかけ、最後に巻取りローラーで巻き取った後、メタノールに約５時間浸漬した後取り出し室温で風乾させ、またはローラーから糸状に巻取りそのまま室温で風乾させ、しなやかなアルギン酸－キトサンハイブリッド繊維（以下、「アルギン酸－キトサンハイブリッド繊維（１）」と呼ぶ）を得た。

第１凝固浴中のキトサン濃度を０.１％（重量／容量）としたことを除いて、上記と同様な方法で紡糸を行ない、しなやかなアルギン酸－キトサンハイブリッド繊維（以下、「アルギン酸－キトサンハイブリッド繊維（２）」と呼ぶ）を得た。

また第１凝固浴中にキトサンを添加しないことを除いて上記と同様な方法で紡糸を行ない、アルギン酸単独の繊維を得た。

【 0 0 2 6 】

製造例 2キトサンとヒアルロン酸のハイブリッド繊維（１）および（２）の製造

キトサン濃度8.5％の条件で紡糸したキトサン単独繊維、キトサン8.5％をヒア

ルロン酸濃度0.05%の凝固液中で紡糸したキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（１）、およびキトサン8.5%をヒアルロン酸濃度0.1%の凝固液中で紡糸したキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（２）を調製した。

8.5（重量/容量）%のキトサン（君津化学工業社製、F2P、分子量：約60,000）を4%酢酸水溶液に溶解した水溶液をカラム（ガラス製、内径45mm、長さ410mm）に詰め、濾布で加圧（ 0.6kgf/cm^2 ）濾過した。この濾液を紡糸用カラム（ガラス製、内径45mm、長さ410mm）に詰め、これを紡糸液として簡易紡糸装置を用い、以下のような方法によって繊維を作製した。50ホール（小孔： $\phi 0.1\text{mm}$ ）のノズルから、 0.8kgf/cm^2 の加圧下で飽和塩化カルシウム水溶液中（第1凝固浴：浴長100cm、容量約2L）に上記紡糸液を押出し、次に水/メタノール＝1/1（容量）に浸漬（第2凝固浴：浴長50cm、容量約1L）し、さらに0.05%ヒアルロン酸溶液（水/メタノール＝1/1（容量））に浸漬（第3凝固浴：浴長50cm、容量約150ml）した後、ローラー（第1ローラー：速度3.2m/min、第2ローラー：3.2m/min、延伸倍率1.0）にかけ、最後に巻取りローラーで巻き取った後、0.8%（重量/容量）の水酸化ナトリウム溶液（水/メタノール＝1/9（容量））に約15時間浸漬後、水で水洗し、さらにメタノールに約1時間浸漬後取り出し室温で風乾させ、またはローラーから糸状に巻取りそのまま室温で風乾させ、しなやかなキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（以下、「キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（１）」と呼ぶ）を得た。

第3凝固浴中のヒアルロン酸濃度を0.1%（重量/容量）としたことを除いて、上記と同様な方法で紡糸を行ない、しなやかなキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（以下、「キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（２）」と呼ぶ）を得た。

また第3凝固浴中にヒアルロン酸を添加しないことを除いて、上記と同様な方法で紡糸を行ない、キトサン単独の繊維を得た。

【0027】

実施例 1

アルギン酸とキトサンのハイブリッド繊維、およびキトサンとヒアルロン酸ハイブリッド繊維での引張強度試験

製造例 1 及び 2 で作製した各繊維の引張強度および伸度を測定した。破断時の荷重および伸び率の測定は JIS 繊維規格 L1015 に従った。また、各繊維の断面積は顕微鏡下での画像処理により求めた。

繊維の破断力および伸度（伸び）の測定方法：

糸状の各繊維（モノフィラメントが 50 本束になったもの）を長さ約 40mm に切断し、両端をそれぞれ接着性のある紙（ここではポストイットを使用）で挟み、標点間距離を 20mm にした各サンプルを作製した。このサンプルの両端をクリップ式つかみ具（製品番号 343-06742-03、島津製作所製）に固定し、上端側のつかみ具をロードセル（20N、製品番号 346-51294-07、島津製作所製）につるした後、卓上型精密万能試験機（AGS-H、製品番号 346-51299-02、島津製作所製）にセットした。引張速度 20mm/min で垂直方向に引張り、破断点での力および変位から破断力および伸度（伸び）を測定し、これらのデータをパソコン（IBM、NetVista A 40）に取込んだ。測定およびデータの解析には専用のソフト（TRAPZUM、島津製作所製）を使用した。

【 0 0 2 8 】

繊維断面積の測定方法：

糸状の各繊維（モノフィラメントが 50 本束になったもの）を長さ約 5mm に切断し、これらを直径約 1mm ϕ の小孔をあけたプラスチック板の穴に挿し固定した。このプラスチック板を光学顕微鏡（BX50、オリンパス光学工業社製）の台座に乗せ、繊維断面の画像を CCD カメラを含むカメラコントロールユニット（ICD-740、池上通信機社製）を通して捕らえた後、画像処理装置（VIDEO MICRO METER : Model VM-30、オリンパス光学工業社製、モニター画面：TM1150、池上通信機社製）によって断面積を測定した。

各繊維の強度及び伸度を表 1 及び 2 に示す。

【表 1】

アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維の強度および伸度
(平均値±標準誤差)

繊維の種類 (n: サンプル 数)	最大点試験力 (N) (n=5)	断面積 (μm^2) (n=5)	強度 (N/mm ²) (n=5)	伸度 (%) (n=5)
アルギン酸繊維	4.31 \pm 0.12	15717.75 \pm 165.27	274.12 \pm 7.59	8.95 \pm 0.99
アルギン酸-キ トサン ハイブリッド 繊維 (1)	4.68 \pm 0.08	20956.56 \pm 631.57	223.09 \pm 3.63	10.59 \pm 0.50
アルギン酸-キ トサン ハイブリッド 繊維 (2)	4.59 \pm 0.09	19497.24 \pm 543.34	235.19 \pm 4.59	12.26 \pm 0.44

【表 2】

キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維の強度および伸度
(平均値 \pm 標準誤差)

繊維の種類 (n: サンプル 数)	最大点試験 (N) (n=5)	断面積 (μm^2) (n=5)	強度 (N/mm ²) (n=5)	伸度 (%) (n=5)
キトサン繊維	1.56±0.06	12199.64 ± 205.47	128.07±4.87	4.26±0.41
キトサン・ヒアルロン酸 ハイブリッド繊維 (1)	2.35±0.08	15397.20 ± 187.03	152.61±5.39	6.11±0.72
キトサン・ヒアルロン酸 ハイブリッド繊維 (2)	4.10±0.16	18843.20 ± 284.69	217.55±8.47	3.14±0.28

上記に示したようにアルギン酸単独繊維の強度は約274N/mm²、アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維の強度は約230N/mm²と、アルギン酸とキトサンのハイブリッド化による繊維強度の低下は僅かであった。

また、キトサン単独繊維の強度は約130N/mm²であったが、ヒアルロン酸とのハイブリッド化によって繊維強度は約150～220N/mm²まで上昇した。

なお、コラーゲンファイバーにノルジヒドログアヤレチン酸を架橋した構造物(ファイバー)での強度は約50N/mm²である(Koob, T. J., et al., J. Biomed. Mater. Res., 56, 40-48 (2001)) ことから、本発明のアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維およびキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維の強度はコラーゲン繊維に比べて3～5倍程度の強度を有することが確認された。

【0029】

実施例 2

アルギン酸とキトサンハイブリッド繊維、およびキトサンとヒアルロン酸ハイブリッド繊維での線維芽細胞接着性試験

線維芽細胞をうまく培養するためには、線維芽細胞が3次元培養担体に出来る

だけ多く接着することが必要である。作製したアルギン酸単独繊維およびアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維、ならびにキトサン単独繊維およびキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維への線維芽細胞の接着性を検討した。コントロールとして市販の医療用吸収性縫合糸：ポリグラクチン-910 (Vicryl, EthiconCo, NJ, USA) を用いた。

(試験方法)

線維芽細胞は滅菌下で日本白色家兎（8～10週齢、体重1.8～2.0kg）の膝蓋腱から分離調製した。線維芽細胞の濃度は 1×10^7 cells/mlとし、細胞の接着性は西村の方法 (Nishimura, J. Biol. Macromol. 7, 100-104, 1985) に準じて評価した。つまり、各繊維を5mmの長さに切断し、テフロン（登録商標）チューブ（内径：5mm、長さ：30mm）に一定量詰めた。このチューブの片端から線維芽細胞を含む試料液1mlを添加し、室温で15分間インキュベートした後、PBS（リン酸緩衝食塩液）1mlを流し、得られた洗浄液中の細胞数をカウントし、繊維に接着していない細胞数とした。

【表3】

各種繊維の線維芽細胞接着性の比較

試料	流出した線維芽細胞数 (平均値±標準誤差、n=5)	
Vicryl	151.1±4.8	
アルギン酸繊維	91.3±4.3	*
アルギン酸-キトサン繊維 (1)	58.2±6.9	*, **
アルギン酸-キトサン繊維 (2)	57.1±7.2	*, **
* : Vicryl に対し危険率 0.05 で有意差あり ** : アルギン酸繊維に対し危険率 0.05 で有意差あり		

【表4】

各種繊維の線維芽細胞接着性の比較

試 料	流出した線維芽細胞数 (平均値±標準誤差、 n=5)
Vicryl	151.1±4.8
キトサン繊維	44.4±7.2 *
キトサン-ヒアルロン酸繊維 (1)	12.0±3.1 *, **
キトサン-ヒアルロン酸繊維 (2)	14.8±7.7 *, **
*: Vicryl に対し危険率 0.05 で有意差あり **: キトサン繊維に対し危険率 0.05 で有意差あり	

上に示すようにVicrylと作製した生体高分子繊維との間には細胞接着性に分散分析法 (ANOVA: analysis of variance) による統計処理で有意な差が認められた。さらにアルギン酸単独の繊維とアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維との間、およびキトサン単独繊維とキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維との間にも有意差があり、線維芽細胞の接着性はともにハイブリッド繊維の方が良いことが認められた。

次に、上記ハイブリッド繊維のうち、アルギン酸濃度4%およびキトサン濃度0.05%で紡糸したアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維(1)を培養担体として用い、線維芽細胞の培養試験を行った。

【0030】

実施例 3

アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維(1)を培養担体に用いた線維芽細胞の培養

Martinの方法 (Martin, G. M., Tissue Culture, Methods and Applications, Academic Press, 39, 1973) に準じて線維芽細胞の採集および培養を行った。すなわち成熟雌日本白色家兎 (8~10週齢、体重1.8~2.0kg) の膝蓋腱から2mm角の小片を作製し、カバーガラスをかけて直径35mmのシャーレに固定した。これに10%FBS (非働化ウシ胎児血清) を添加したDMEM (Dulbecco's Modifie

d Eagle's Medium、SIGMA社製、製品コードD5796)を加え、5%CO₂存在下、37℃の培養器で2週間培養した。線維芽細胞がコンフルエントな状態(群状態、集合状態)になったところで培地を除き、PBS(-)で洗浄した。0.25%トリプシン0.5mlを加えて37℃で15分間インキュベート後、培地1mlを添加し、細胞を回収した。この細胞懸濁液50μlおよび0.04%トリパンブルー50μlを加え血球計算盤で細胞数をカウントした。

予めオートクレーブ滅菌しておいたアルギン酸-キトサンハイブリッド繊維の束(長さ:約5mm、直径:約2mm)を12穴のプレートに置き、繊維上に各プレート当たり 1×10^6 個となるように線維芽細胞を含む溶液約100μlを添加した。5%CO₂存在下、37℃の培養器で1時間インキュベートした後、DMEM培地約2mlを添加し上記条件下で培養した。培養3週間後(21日後)の培養状況を光学顕微鏡下で観察し、0日目と比較した。

図1及び2に示すように、播種した線維芽細胞は繊維上で良好に増殖していることが分かる。また、図3は抗マウス抗体を用いたstreptavidin - biotin法によるI型コラーゲンの免疫組織染色の結果を示したが、細胞外基質が染色されており、このハイブリッド繊維は細胞外マトリックスであるI型コラーゲンの産生にも優れていることが判る。

【図面の簡単な説明】

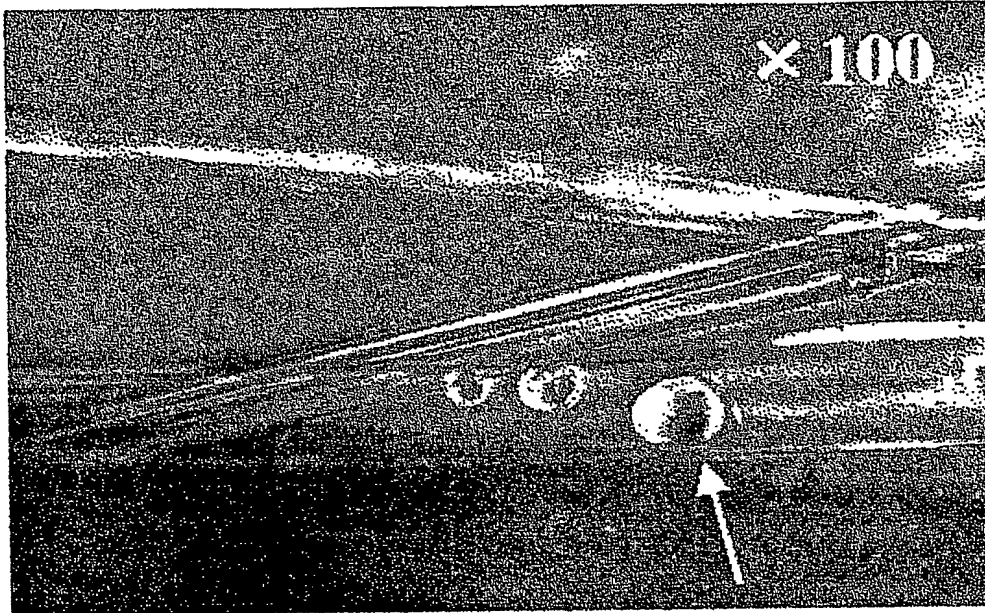
【図1】 アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維を担体として用いた線維芽細胞の培養開始時の光学顕微鏡写真を示す。

【図2】 アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維を担体として用いた線維芽細胞の培養3週間後の光学顕微鏡写真を示す

【図3】 アルギン酸-キトサンハイブリッド繊維を担体として用いた線維芽細胞の培養における細胞外マトリックスであるI型コラーゲンの産生を示す。

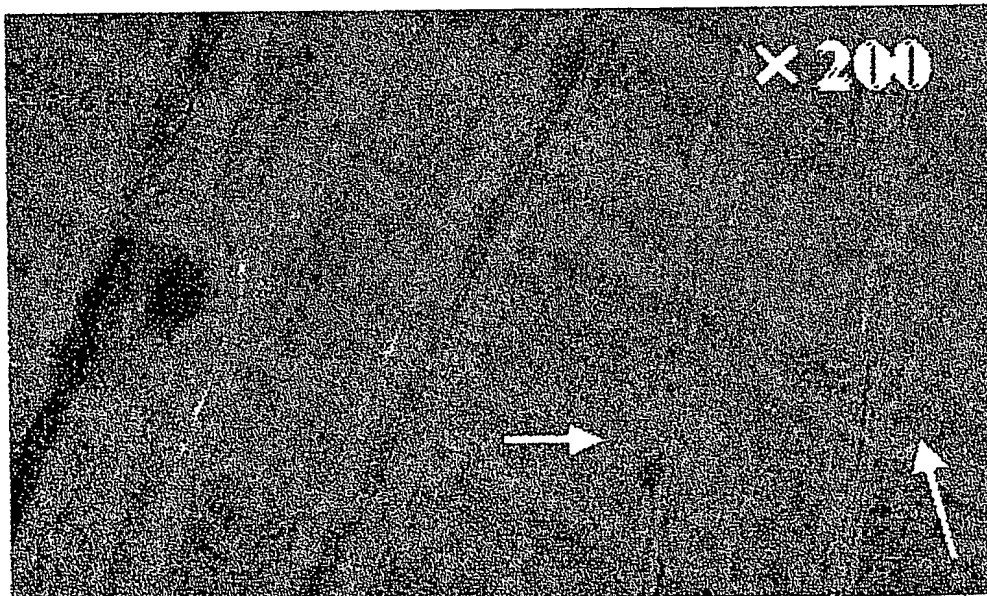
【書類名】 図面

【図1】



0日目

【図2】



21日後

【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 損傷した靱帯または腱を再生させるための、生分解性、生体適合性を有し、十分な機械的強度、弾力性および柔軟性を保持した靱帯または腱再生用基材を提供することを目的とする。

【解決手段】 酸性生体高分子と塩基性生体高分子との複合体を少なくともその表面に含む成形物よりなる担体を用いて線維芽細胞を生体外で培養することにより上記課題は解決される。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500503551]

1. 変更年月日 2001年10月' 3日

[変更理由] 住所変更

住 所 北海道札幌市清田区美しが丘四条9丁目2番1号
氏 名 株式会社生物有機化学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.